

· 论著 ·

雷公藤次碱通过调控 TLR4/MyD88/TRAF6 信号通路抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应

汪 滢^a, 张敏新^a, 林 兵^b (中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院, a. 临床药学科; b. 药剂科, 福建 福州 350025)

[摘要] **目的** 探讨雷公藤次碱抗炎活性及其作用机制。**方法** 用细胞计数盒-8 (CCK-8) 法考察雷公藤次碱对小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW 264.7 增殖活性的影响, 用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测雷公藤次碱对脂多糖 (LPS) 诱导的 RAW264.7 细胞分泌细胞因子一氧化氮 (NO)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素 6 (IL-6) 的影响, 用免疫印迹法考察雷公藤次碱对白细胞介素受体相关激酶 (IRAK)、肿瘤坏死因子受体相关蛋白 6 (TRAF6)、核因子 κ B 抑制因子 α (I κ B α)、核因子 κ B (NF- κ B p65)、分裂原激活的蛋白激酶 p38 (p38)、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 在 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中的表达及其磷酸化的影响。**结果** 雷公藤次碱在 25、50、100 μ mol/L 浓度下对 RAW264.7 细胞无显著毒性, 并可显著抑制细胞因子 NO、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 含量。免疫印迹法检测结果显示雷公藤次碱可显著抑制 IRAK 及 TRAF6 的表达; 显著抑制 ERK、P38 和 JNK 的磷酸化; 抑制 I κ B α 的降解, 降低 NF- κ B p65 的核转运水平。**结论** 雷公藤次碱具有体外抗炎活性, 其作用机制可能介导 TLR4/MyD88/TRAF6 信号通路。

[关键词] 雷公藤; 雷公藤次碱; 抗炎; toll 样受体 4; 髓样分化因子 88; 核因子 κ B

[中图分类号] R285 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-2024(2022)06-0505-05

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202111068

Wilforine inhibits LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 cells by regulating the TLR4/MyD88/TRAF6 signaling pathway

WANG Ying^a, ZHANG Minxin^a, LIN Bing^b (a. Department of Pharmacy; b. Department of Clinical Medicine, No. 900 Hospital of Joint Logistics Force of the PLA, Fuzhou 350025, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the anti-inflammatory effect and mechanism of wilforine. **Methods** Anti-inflammatory activity of wilforine was investigated in LPS-induced RAW264.7 cells. The cytokines production of RAW264.7 cells was analyzed by ELISA assay and the cell viability was assessed by CCK-8 method. The expression of TRAF6, the phosphorylation of IRAK, p38, ERK and JNK, the degradation of inhibitory κ B α (I κ B α) and the nuclear translocation of NF- κ B p65 were further investigated by western blot. **Results** Triptolide had no significant toxicity to RAW264.7 cells at concentrations of 25, 50 and 100 μ mol/L. and could significantly inhibit the contents of cytokines NO, IL-1 β , TNF- α and IL-6. Wilforine significantly decreased the expression of TRAF6 and phosphorylation of IRAK, and inhibited the phosphorylation of ERK, p38, and JNK and degradation of I κ B α , and reduced the level of nuclear translocation of NF- κ B p65. **Conclusion** The anti-inflammatory activity of wilforine of LPS-induced RAW264.7 cells is probably via TLR4/MyD88/TRAF6 signaling pathway.

[Key words] *Tripterygium wilfordii*; wilforine; anti-inflammation; TLR4; MyD88; NF- κ B

雷公藤为卫矛科雷公藤属植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook.f. 的干燥根, 是一种公认的同时具有较强药效和较强毒性的中药材, 广泛用于治疗类风湿性关节炎、肾病综合征、系统性红斑狼疮等疾病^[1]。但其毒性较大, 不良反应高发且严重, 常使患者不

能耐受^[2]。雷公藤的主要有效成分为二萜类、三萜类和生物碱类, 研究表明各种成分均具有不同程度的抗炎、抗肿瘤和免疫抑制等活性^[3-4], 其中生物碱的毒性要小于二萜和三萜类成分, 临床应用具有疗效好, 不良反应较小的特点^[5]。雷公藤次碱是雷公藤生物碱中含量较高的一种倍半萜类单体化合物。目前研究显示其具有良好的杀虫活性, 其他药理活性和机理研究较少, 特别是抗炎和免疫抑制活性方面。

本研究主要通过建立脂多糖 (LPS) 诱导的

[基金项目] 福建省自然科学基金资助项目 (2017J05135)

[作者简介] 汪 滢, 硕士, Tel: 18596768230, Email: yingwang@163.com

[通信作者] 林兵, 主管药师, 博士, 研究方向: 天然产物活性研究, Email: yaoxuelinhao@163.com

RAW264.7 细胞炎症模型, 探讨雷公藤次碱对 LPS 诱导的炎症因子 NO, IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 释放的影响, 用免疫印迹法考察雷公藤次碱对 TRAF6、IRAK、NF- κ B、I κ B α 、JNK、ERK、p38 等关键蛋白表达或磷酸化的影响, 探讨其可能的抗炎作用机制, 为促进雷公藤次碱的应用研究提供基础。

1 试剂与材料

雷公藤次碱(纯度 98%, 上海纯优生物科技有限公司); DMEM 细胞培养基、胎牛血清 (Life Technologies GIBCO); Griess 试剂、细胞计数盒-8 (CKK-8)(上海碧云天生物技术有限公司); 脂多糖 (LPS, Sigma-Aldrich); IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 检测试剂盒(达科为生物技术有限公司); 核质提取试剂盒 (Dojindo Laboratories); TRAF6、IRAF、p-IRAF、p-p38、p38、p-JNK、JNK、p-ERK、ERK、p-I κ B α 、I κ B α 、NF- κ B p65、 β -actin、HRP 山羊抗兔抗体 (Cell Signaling Technology); RAW264.7 细胞购自中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 RAW264.7 细胞培养及炎症模型建立

RAW264.7 细胞在含 10% 的新生小牛血清及 100 U/ml 青霉素、链霉素的 DMEM 高糖培养液中进行培养, 培养条件为 5% CO₂、37 °C, 隔天换液, 每日观察细胞的生长状况。实验时取对数生长期 RAW264.7 细胞, 胰酶消化, 加入新鲜培养基反复吹打成细胞混悬液, 细胞增殖实验、细胞因子分泌含量测定调整细胞浓度为 1 $\times$ 10⁵ cells/ml, 以每孔 100 μ l 细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板中, 细胞蛋白表达测定调整细胞浓度到 2.25 $\times$ 10⁵ cells/ml, 以每孔 2 ml 接种于 6 孔细胞培养板中, 然后细胞置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养过夜。在药物处理前 2 h 给予 LPS 溶液(使其终浓度为 1 μ g/ml)诱导 RAW264.7 细胞发生炎症反应建立模型。设空白组(不给予 LPS 和药物处理)、模型组(给予 LPS 处理)、药物组(给予 LPS 诱导后再给予相应浓度的药物进行处理), 每组设 6 个复孔 ($n=6$)。

2.2 RAW264.7 细胞增殖实验

设空白组和药物组, 药物组分别给予终浓度为 200、100、50 和 25 μ mol/L 的雷公藤次碱药液进行处理。细胞分别培养 24 和 48 h, 实验结束 4 h 前加入 10 μ l CCK-8 试剂, 结束后以酶标仪于 450 nm 处检测吸光度(A)。

2.3 RAW264.7 细胞分泌 NO、IL-1 β 、TNF- α 和

IL-6 含量的测定

设空白组、模型组和药物组, 药物组细胞给予 LPS 诱导后分别给予终浓度为 100、50、25 μ mol/L 的药液进行处理。细胞培养 24 h 后取出, 吸取细胞上清液, Griess 试剂法检测上清中 NO 光密度值, ELISA 试剂盒检测上清中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的光密度值。

2.4 RAW264.7 细胞中 TRAF6、NF- κ B p65、I κ B α 、IRAK、p-IRAK、p-p38、p38、p-JNK、JNK、p-ERK 和 ERK 表达分析

设空白组、模型组和药物组, 药物组细胞给予 LPS 诱导后分别给予终浓度为 100、50、25 μ mol/L 的药液进行处理。细胞培养 24 h 后取出, 用 4 °C 预冷的 PBS 液洗涤各孔两次, 然后, 吸弃 PBS 液, 每孔中加入 200 μ l 4 °C 预冷的 RIPA 提取细胞蛋白, 在 13 000 r/min 下离心 20 min, 弃去上清, 得各样本。用 Bradford 法对蛋白定量; 使用细胞核/质提取试剂盒制备用于检测 p65/NF- κ B 的胞质和核提取物。每孔加入 20 μ g 蛋白上样, 在 SDS-PAGE 凝胶中电泳, 蛋白转移到 PVDF 膜上, 用 BSA 封闭 2 h。分别用相应一抗 4 °C 孵育过夜, 然后用与辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:1000)孵育 2 h。最后用 ECL 超敏发光液显影, 于凝胶成像仪中曝光, 使用 LAS 成像软件对条带进行定量分析

2.5 统计分析与灰度分析

实验数据的统计分析用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析法进行统计学处理。应用 Alpha 软件处理 Western Blot 实验所得目标带的光密度值, 并以各自的 β -actin 蛋白条带灰度值与目标条带灰度值的比值作为蛋白相对表达水平值。

3 结果

3.1 雷公藤次碱对 RAW264.7 细胞活力的影响

图 1 显示了不同浓度雷公藤次碱对 RAW264.7 细胞的细胞毒性作用。给予雷公藤次碱(25 ~ 200 μ mol/L)孵育 24 h 后, 200 μ mol/L 雷公藤次碱可显著抑制 RAW264.7 细胞活性; 孵育 48 h 后, 50、100 和 200 μ mol/L 雷公藤次碱均可显著抑制 RAW264.7 细胞的活性。

3.2 雷公藤次碱对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞分泌炎症因子的影响

为了进一步研究雷公藤次碱体外抗炎活性, 检测了雷公藤次碱对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞分泌炎症因子的影响。结果显示(图 2), 给予 LPS 刺激后的 RAW264.7 细胞, NO、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6

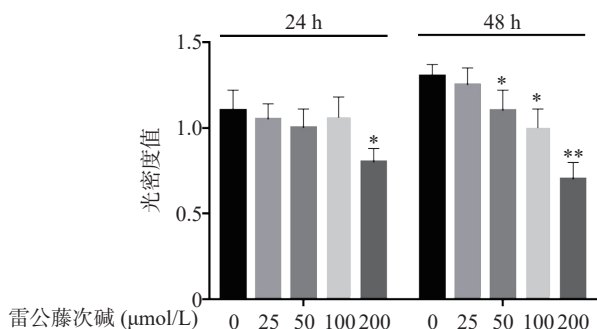


图1 雷公藤次碱对 RAW264.7 细胞活力的影响

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与空白组比较

等促炎因子释放水平急剧增加($P<0.01$), 给予不同浓度雷公藤次碱(100、50 和 25 $\mu\text{mol/L}$)处理后, 上述因子分泌水平呈剂量依赖性显著降低($P<0.01$)。由此提示, 雷公藤次碱的抗炎作用可能与抑制细胞释放 NO、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 等促炎因子有关。

3.3 雷公藤次碱对 IRAK 磷酸化和 TRAF6 表达的影响

LPS 是引发炎症的早期关键因素, 可诱发多种细胞内信号事件, LPS-TLR4/MyD88 信号通路可调节促炎基因表达, 并控制炎症相关细胞因子的表达, 其中 IRAK 及 TRAF6 是 MyD88 依赖性途径中的关键信号传导的分子。TLR4 受体受 LPS 诱导后, 可导致 IRAK 磷酸化从而脱离 MyD88 与 TRAF6 的结合体, 使得游离的 TRAF6 活化后续信号转导途径^[6]。为了评估雷公藤次碱对 LPS 激活 TLR4/MyD88 信号通路的影响, 蛋白印迹法考察了雷公藤次碱对 IRAK 磷酸化和 TRAF6 表达的影响。结果显示(图 3), 与空白组相比, LPS 刺激的模型组

IRAK 磷酸化和 TRAF6 表达明显增加($P<0.01$); 与模型组相比, 雷公藤次碱各剂量组可显著抑制 IRAK 磷酸化和降低 TRAF6 表达($P<0.01$)。

3.4 雷公藤次碱对 I κ B α 磷酸化和 NF- κ B p65 核转位的影响

NF- κ B 是 MyD88 信号通路中重要的转录因子^[7]。我们考察了雷公藤次碱对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NF- κ B 活化的潜在影响。如图 4 所示, RAW264.7 细胞 LPS 刺激后, 细胞核内 NF- κ B p65 水平增高而细胞质内 NF- κ B p65 水平降低, 说明 NF- κ B p65 活化后由细胞质进入到细胞核内, 而给予雷公藤次碱处理后, 细胞质内 NF- κ B p65 水平增高而细胞核内 NF- κ B p65 水平降低, 说明雷公藤次碱以浓度依赖的方式显著地阻止了 NF- κ B p65 从细胞质转运到细胞核。NF- κ B p65 易位进入核内与 TLR4 途径中的 I κ B α 磷酸化有关。因此, 我们考察了雷公藤次碱对 NF- κ B 抑制蛋白 I κ B α 磷酸化的影响。结果表明, 雷公藤次碱以浓度依赖的方式显著抑制 LPS 诱导的 I κ B α 磷酸化和降解。

3.5 雷公藤次碱对 p38, ERK 和 JNK MAPKs 磷酸化的影响

MAPKs 是信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者。为了进一步研究雷公藤次碱是否调节 MAPKs, 考察了其对于 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 ERK、p38 和 JNK 等 MAPKs 磷酸化的影响。如图 5 所示, LPS 暴露可显著促进 RAW264.7 细胞中 ERK、JNK 和 p38 的磷酸化。给予雷公藤次碱可以显著抑制 LPS 诱导的 ERK、p38 和 JNK

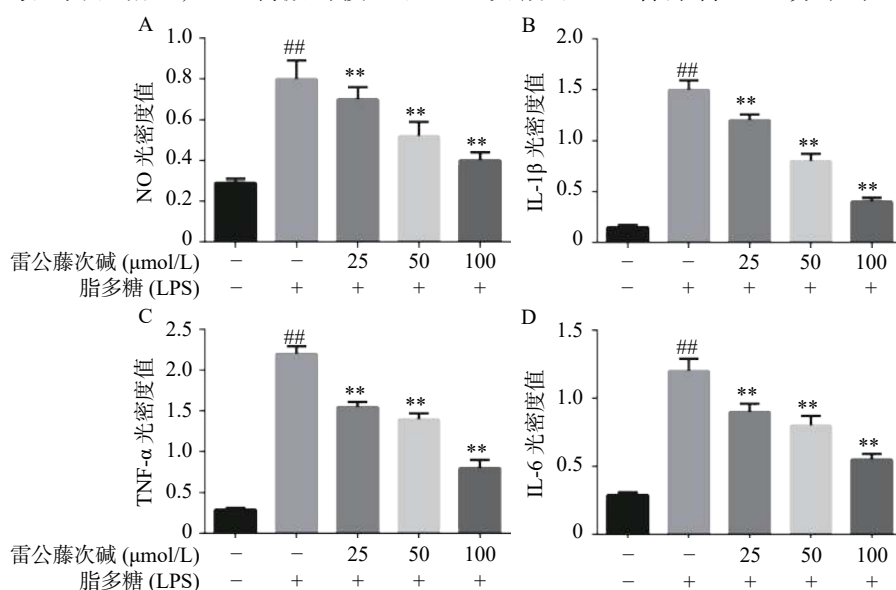


图2 雷公藤次碱对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌炎症因子的影响

A. NO 光密度值; B. IL-1 β 光密度值; C. TNF- α 光密度值; D. IL-6 光密度值

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与模型组比较; ## $P<0.01$, 与空白组比较

的磷酸化,但并未影响 ERK、p38 和 JNK 的表达。上述结果表明,MAPKs 的磷酸化可能参与了雷公藤次碱对 RAW264.7 细胞中 LPS 刺激炎症的抑制作用。

4 讨论

雷公藤次碱是雷公藤的代表性生物碱成分之一,但是自从被分离以来,其生物学活性除了杀虫外,其他方面了解甚少^[8]。本研究显示,雷公藤次碱对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型显示出显

著的抗炎活性。雷公藤次碱可减少 LPS 刺激引起的 NO、IL-1 β 、TNF- α 及 IL-6 等促炎因子的产生,并抑制 LPS 诱导的 TLR4/MyD88 通路中信号传导的分子 IRAK 磷酸化及 TRAF6 表达,从而影响 MAPKs 和 NF- κ B 的激活,如图 6 所示。

已有证据显示,LPS 可引发多种细胞内信号事件,包括导致 TLR4、NF- κ B 及 p38、ERK 和 JNK 等丝裂素活化蛋白激酶(MAPKs)途径激活^[9-10]。研究发现,LPS 诱导后 RAW264.7 细胞 Toll 样受体 4(TLR4)的表达明显增高,说明 LPS 是或可引导

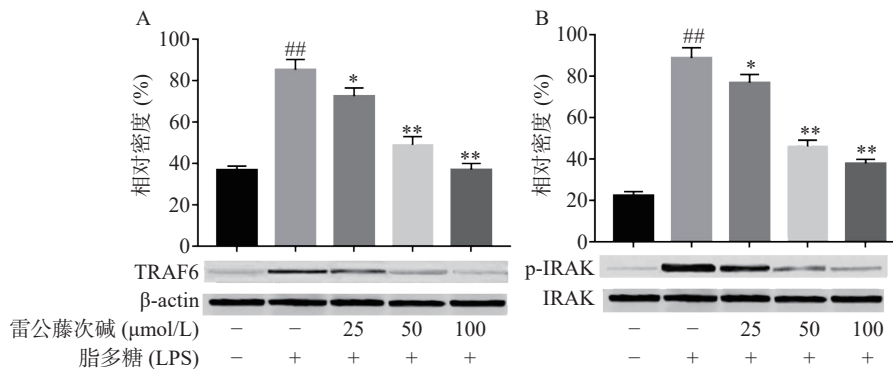


图 3 雷公藤次碱对 TRAF6 表达和 IRAK 磷酸化的表达的影响

A. TRAF6 磷酸化; B. IRAK 磷酸化

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与模型组比较; ^{##} $P < 0.01$, 与空白组比较

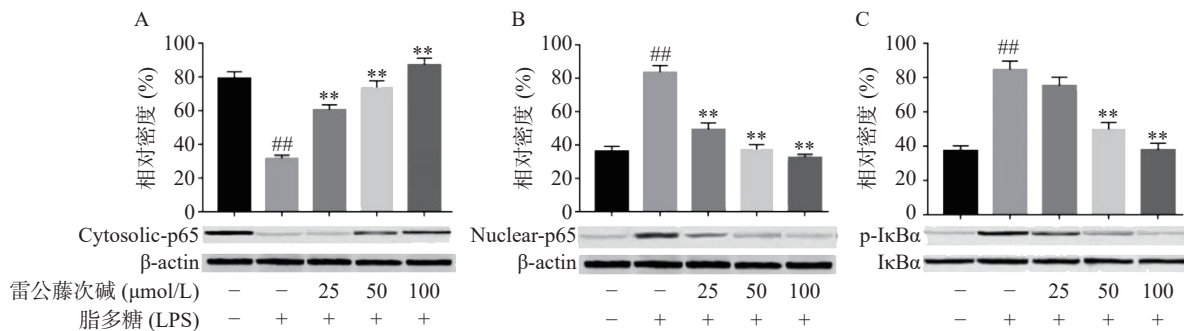


图 4 雷公藤次碱对 IκBα 磷酸化和 NF-κB 核转位的影响

A. 细胞质 NF-κB p65 含量; B. 细胞核 NF-κB p65 含量; C. IκBα 磷酸化

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与模型组比较; ^{##} $P < 0.01$, 与空白组比较

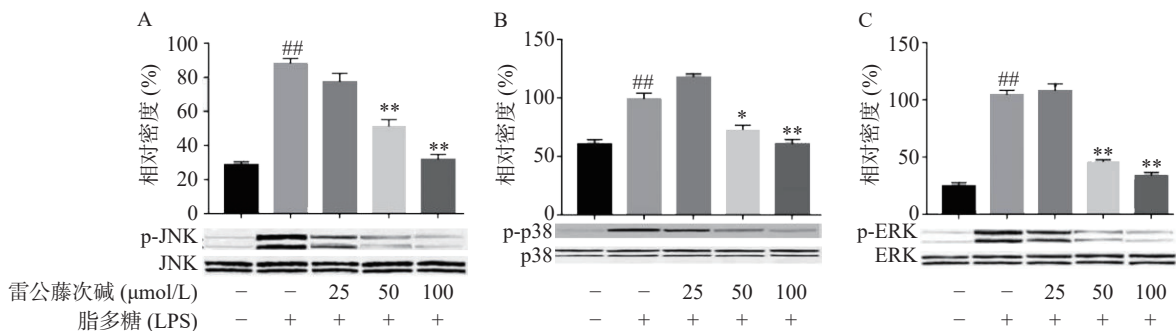


图 5 雷公藤次碱对 p38、ERK 和 JNK MAPKs 磷酸化的影响

A. JNK 磷酸化; B. p38 磷酸化; C. ERK 磷酸化

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与模型组比较; ^{##} $P < 0.01$, 与空白组比较

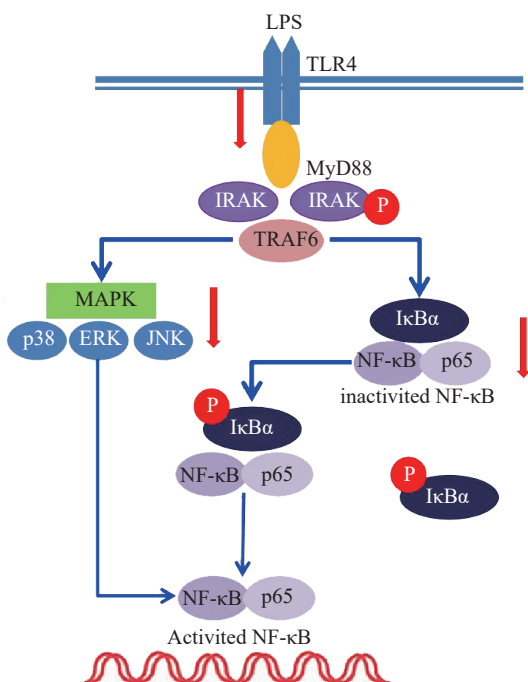


图 6 雷公藤次碱抗炎调控机制

TLR4 的配体与 TLR4 结合,二者结合后可启动细胞内一系列信号级联反应,最终诱导目的基因的表达。TLRs 亚型中除 TLR3 外,均需要髓样分化因子 88(MyD88)来激活下游释放信号分子的通路,这种途径成为 MyD88 依赖性途径。静息状态下,MyD88 与 IRAK 及 TRAF6 形成细胞信号转导复合物,受到诱导后导致 IRAK 磷酸化,IRAK 磷酸化后 TRAF6 从信号转导复合物中解离出来,TRAF6 的活化可引起两条不同的信号转导途径,一条为 MAPK 家族(包括 p38、JNK),另一条为活化 MP3K (mitogen activated protein kinase kinase)家族成员 NIK(NF- κ B inducing kinase),后者的磷酸化激活 I κ B 激酶,导致 I κ B 的磷酸化而使 NF- κ B/I κ B 复合物解离,NF- κ B 由此活化转位进入细胞核^[11]。在本研究中,数据显示雷公藤次碱可以抑制 IRAK 磷酸化和 TRAF6 的表达。

NF- κ B 是一种多效性的转录因子,参与调控炎症反应、免疫、肿瘤等相关的细胞因子、趋化因子、黏附分子、炎症介质等的转录过程。I κ B 是其抑制蛋白,正常情况下二者结合而使 NF- κ B 处于失活状态,I κ B α 是 I κ B 的亚分子,受到 LPS 刺激,I κ B α 磷酸化增加,从而导致游离 NF- κ B p65 释放并从细胞质转移至细胞核,与 DNA 上的相应位点结合,导致特定靶基因(如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6)的转录表达^[12-13]。在本研究中,数据显示雷公藤次碱可抑制 I κ B α 磷酸化,并以浓度依赖的方式阻止 NF- κ B p65 由细胞质进入细胞核,从而阻止炎症相

关因子的转录表达。

此外,NF- κ B 的易位也受 ERK、p38 和 JNK 等丝裂素活化蛋白激酶途径调节,该途径可控制炎症反应过程中细胞因子的合成和释放。丝裂素活化蛋白激酶激活后,细胞质或细胞核中的转录因子又被激活,从而触发引起生物学反应的靶基因的表达,包括促炎性介质的表达。本研究显示,LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中,雷公藤次碱可显著抑制 ERK、JNK 和 p38 的磷酸化。

【参考文献】

- [1] 白雪,付瑞嘉,乐世俊,等.雷公藤治疗类风湿性关节炎研究进展[J].*中草药*,2020,51(1):265-275.
- [2] 姚骥如,孙莹,罗顺葵,等.雷公藤多苷的临床应用进展[J].*中国新药与临床杂志*,2010,29(3):179-182.
- [3] 胡攀勇,李振麟,濮社班,等.雷公藤研究进展[J].*中国野生植物资源*,2013,32(2):1-3,7.
- [4] ZHANG Y Q, XU W, LI H, et al. Therapeutic effects of total alkaloids of *Tripterygium wilfordii* Hook f. on collagen-induced arthritis in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(3): 699-705.
- [5] 刘莉,闫君,舒积成,等.雷公藤生物碱类成分及其药理活性研究进展[J].*天然产物研究与开发*,2019,31(12):2170-2181.
- [6] LI T, LI F, LIU X Y, et al. Synergistic anti-inflammatory effects of quercetin and catechin via inhibiting activation of TLR4-MyD88-mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. *Phytother Res*, 2019, 33(3): 756-767.
- [7] 鲍璐璐,崔立红. TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的研究进展[J].*胃肠病学和肝病杂志*,2019,28(5):568-572.
- [8] 师宝君,姬志勤,张继文,等.昆明山海棠的杀虫活性及有效成分[J].*昆虫学报*,2007,50(8):795-800.
- [9] LAI J L, LIU Y H, LIU C, et al. Indirubin inhibits LPS-induced inflammation via TLR4 abrogation mediated by the NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. *Inflammation*, 2017, 40(1): 1-12.
- [10] LIU F, SUN G Q, GAO H Y, et al. Angelicin regulates LPS-induced inflammation via inhibiting MAPK/NF- κ B pathways[J]. *J Surg Res*, 2013, 185(1): 300-309.
- [11] 单佳铃,程虹毓,文乐,等. TLR/MyD88/NF- κ B 信号通路参与不同疾病作用机制研究进展[J].*中国药理学通报*,2019,35(4):451-455.
- [12] 崔嵩,刘学锋,吴斌. NF- κ B 在肿瘤中的研究进展[J].*现代肿瘤医学*,2009,17(1):134-137. 范慧婕,谭章斌,赵晓山,等. 四逆散通过 MAPKs/NF- κ B 途径保护脂多糖致 Raw264.7 的细胞炎症[J].*暨南大学学报(自然科学与医学版)*,2019,40(1):10-18.
- [13] KAMINSKA B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy: from molecular mechanisms to therapeutic benefits[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1754(1-2): 253-262.

【收稿日期】 2021-11-16 【修回日期】 2022-09-07

【本文编辑】 陈盛新